


Patent number: CN1457822
Publication date: 2003-11-26
Inventor: CAI YIMING (CN); LIU SUYING (CN)
Applicant: TIANYUAN BIOCHEMICAL SCIENCE A (CN)
Classification:
- **international:** A61K35/78; A61P19/08; A61P19/10
- **european:**
Application number: CN20020119186 20020514
Priority number(s): CN20020119186 20020514

Also published as:

 WO03094940 (A1)

Abstract of CN1457822

The medicine is prepared with lettuce seed, eaglewood, rice, frankincense, white atractylodes rhizome and dodder seed as raw materials. Through traditional Chinese medicine preparing process, the medicine in troche, soft capsule, granule, decoction or bolus is prepared. The present invention has unique recipe and obvious fracture and osteoporosis treating effect.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 35/78

A61P 19/08 A61P 19/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02119186.7

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1457822A

[22] 申请日 2002.5.14 [21] 申请号 02119186.7

[71] 申请人 天骥生化科技股份有限公司

地址 中国台湾

[72] 发明人 刘素莹 蔡宜明

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 6 页

[54] 发明名称 预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物

[57] 摘要

本发明公开了一种新的预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，它是以莴苣子、沉香、稻米、乳香、白术及菟丝子为原料，药物的各组分分配比为：(用量为重量份)沉香 2~20，稻米 1~5，白术 0.1~1，菟丝子 0.1~1，乳香 0.1~1，莴苣子 0.1~1。以传统的中医方法及萃取方法制成的锭剂或软胶囊或颗粒剂或液剂或胶囊剂或丸剂。本发明配方独特，预防及治疗骨折与骨质疏松症的效果显著。

ISSN 1008-4274

1、一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，其特征在于：它是由下列原料制成的药剂：葛苳子、沉香、稻米、乳香、白术、菟丝子，其中各原料的重量份配比是：

沉香	2~20	稻米	1~5
乳香	0.1~1	葛苳子	0.1~1
白术	0.1~1	菟丝子	0.1~1

2、按照权利要求 1 所述的一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，其特征在于：其中各原料的重量份配比是：

沉香	3~7	稻米	1~3
乳香	0.3~0.7	葛苳子	0.3~0.7
白术	0.2~0.4	菟丝子	0.3~0.7

3、按照权利要求 2 所述的一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，其特征在于：其中各原料的重量份配比是：

沉香	5	稻米	2
乳香	0.5	葛苳子	0.5
白术	0.25	菟丝子	0.5

4、按照权利要求 1 或 2 或 3 所述的一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，其特征在于：所说的药剂是任何一种药剂学上所说的剂型。

5、按照权利要求 4 所述的一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，其特征在于：所说的剂型为锭剂或软胶囊或颗粒剂或粉末剂或液剂或胶囊剂或丸剂，或注射剂或软膏剂。

预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物

技术领域

本发明是一种预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物，具体地说以中草药为原料制备的中成药。

背景技术

骨质疏松症在各年龄层及各种族群都是很严重的问题，它的发生率随着年龄的增加而增加。一般来说，骨头因疏松而变薄、变脆弱、容易造成骨折，特别是腕骨、股骨及脊椎骨。而骨质疏松症最明显的症状，就是脊椎压迫性骨折，它会引起背部酸痛、身高变矮及驼背现象，骨质密度在35—40岁时到达高峰，50岁女性在停经后，骨质原本致密的骨头变成中空疏松，即为骨质疏松症，而停经妇女就以每年1—3%的速度流失，女性患骨质疏松症是男性的二倍。

现临床用药有双磷酸盐、特异雌激素受体调节剂、抑钙素及雌激素，上述药物都是作用在抑制破骨细胞上，而作用在造骨细胞上的只有副甲状腺素，这些药都有其副作用，且长期使用的安全性还不清楚，不幸的是骨质疏松症的病人都需长期服用，其中抑钙素和副甲状腺素是属于蛋白质药物，必须以注射或喷鼻方式投药，十分不便。

而在目前提倡自然疗法的时代，一般强调治疗或是保健骨质疏松症，不外运用多摄食含钙量高的食物，如多喝牛奶或是乳制品，小鱼干、豆类食品及深色蔬菜等。当然适当的负重运动能抑制骨质流失速度，预防骨质疏松症。若运动量不足，骨质流失较快。

虽然在某些文献或是专利中论及运用天然食品或是中草药，可实现预防或是治疗骨质疏松症的效果。例如 Diane Feskanich 等人于1999年 Am. J. Clin. Nutr. 第69卷第674—679页报导，38—63岁妇女由葛苣（非本发明之葛苣子）摄取维生素K，有益于骨骼健康与血液凝结。L. Cui, Y. F. Ma. 等人于1999年 J. of Bone and Mineral Research 第14卷第 Suppl.1 期S283页报导，摘除卵巢的老鼠日喂食1.0g/kg 经热水萃取的淫羊藿、黄耆与白术混合粉末，可抑制骨吸收。胡学攀于1995年中国专利号为：94105130.7的专利公开了，以石膏、桂枝、陈皮、麻黄、白芍、枳壳、川芎、茯苓、牡丹皮、半夏、白术、厚朴、黄芩、青皮、苏子、西党参、当归、柴胡、附子、桃仁的散剂处方，有消炎健骨、治疗骨髓炎、骨

质增生作用。柳海峰于 1993 年中国专利号为 93104876.1 号专利,公开了以沉香、西红花、木香、川芎、桂枝、白芷、三七、川续断、土鳖虫、骨碎补、制马钱子、牛膝、黄瓜子、鸡骨、大黄、自然铜、冰片、血竭的散剂处方,具有补肾强骨,治疗成骨不全、软骨发育不良的作用。船田正等人于 1992 年日本第 4-266820 号公开专利,由米糠油分离出来含有碳数 22 至 38 的直链饱和醇类,可预防骨质流失且增加骨质增生。

发明内容

本发明的目的是提供一种具有很强的生物活性,具有预防及治疗骨折与骨质疏松症的药物。

本发明的解决方案是基于祖国医学对骨折及骨质疏松症的认识及治疗原则,参考现代药理研究成就,从祖国医药宝库中,筛选出天然食用植物药,按中医理论组方,提取精华,使其发挥刺激骨形态产生蛋白质-2 及成骨细胞分裂作用,提高骨折后的愈合速度,降低骨质疏松症发生的速度,并可对骨质疏松症有治疗作用。

本发明药物包括下列原料:

沉香、稻米、乳香、葛苣子、白术、菟丝子。

本发明药物的各组分的配比为:(用量为重量份)

沉香	2~20	稻米	1~5
乳香	0.1~1	葛苣子	0.1~1
白术	0.1~1	菟丝子	0.1~1

本发明药物的优选配比为:(用量为重量份)

沉香	3~7	稻米	1~3
乳香	0.3~0.7	葛苣子	0.3~0.7
白术	0.2~0.4	菟丝子	0.3~0.7

本发明药物的最佳配比为:(用量为重量份)

沉香	5	稻米	2
乳香	0.5	葛苣子	0.5
白术	0.25	菟丝子	0.5

上述六种药材中，莒菝子是菊科植物莒菝的干燥种子；沉香是瑞香科植物沉香的含树脂木材；稻米是禾本科植物稻的果实；乳香是橄榄科植物卡氏乳香树或同属植物的树干皮部所得的胶状树脂；白术是菊科植物白术的干燥根茎；菟丝子是旋花科植物菟丝子、南方菟丝子或日本菟丝子的干燥种子。

本发明药物按常规的方法可制成锭剂、软胶囊、颗粒、粉剂、液剂、胶囊或丸剂、注射剂、软膏剂。

本发明药物的粉剂中可添加佐料，如乳糖、淀粉、微晶纤维素、帝摩杰（PRIMOJEL™）普杰（PREJEL™）枯罗素摩罗钠（sodium crosscarmellose）、羟甲基纤维素、波维栋（povidone）及硬脂酸镁或其它常用的赋形剂，制成所需要的剂型。

本发明可依照传统或是现代的中药方剂的制备方法制成传统的或是现代的中药方剂，也可依照一般西药剂型的制备方法制成常用的西药剂型。

附图说明

图 1 为家兔桡骨在手术后 23 天对照组，骨折断端的组织照片。

图 2 为家兔桡骨在手术后 23 天给药组，骨折断端的组织照片。

图 3 为家兔桡骨在手术后 30 天对照组，骨折断端的组织照片。

图 4 为家兔桡骨在手术后 30 天给药组，骨折断端的组织照片。

图 5 为老鼠假手术对照组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 6 为老鼠去势 30 天的去势组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 7 为老鼠去势 70 天的去势组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 8 为老鼠去势 30 天后再给药处理 40 天组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 9 为老鼠假手术组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 10 为老鼠去势 100 天的去势组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

图 11 为老鼠去势 30 天后再给药处理 70 天组，股骨下端骨骺板下骨小梁结构照片。

具体实施方式

本发明药物的生物活性试验包括：

- (1) 刺激骨形态产生蛋白质-2 作用试验；
- (2) 对成骨细胞分裂刺激作用的试验；
- (3) 促进家兔骨折模型愈合的体内试验；
- (4) 防治去势大鼠骨质疏松症体内试验；
- (5) 小鼠醋酸扭体体内试验；
- (6) 小鼠游泳能力(负重)体内试验；
- (7) 大鼠口服急性毒性体内试验；
- (8) 大鼠口服长期毒性体内试验；

上述的(1)试验用本发明药物散剂 A、散剂 B；

上述的(2)试验用本发明药物散剂 C；

上述的(3)试验用本发明药物蜜丸；

上述的(4)试验用本发明药物散剂 C；

上述的(5)试验用本发明药物散剂 B；

上述的(6)试验用本发明药物散剂 B；

上述的(7)试验用本发明药物散剂 C；

上述的(8)试验用本发明药物散剂 B；

散剂 A 剂型的制备方法如下：

将 2000 克沉香、800 克稻米、200 克乳香、200 克莒菖子、100 克白术及 200 克菟丝子，分别粉碎成粉末并混合均匀，过 100 目筛网制成。

散剂 B 剂型的制备方法如下：

将 400 克沉香、267 克稻米分别研磨成粉，并经 60 目筛网过筛；

另取 533 克稻米、200 克乳香、1600 克沉香、200 克莒菖子、100 克白术及 200 克菟丝子置于萃取锅内，以去离子水加以浸泡，并加热至 100℃持续 2.5 小时。收取萃取液，经 100 目筛网过筛后，减压加热浓缩。

将浓缩液与已经过筛的 267 克稻米粉末及 400 克沉香粉末混合，制成颗粒，将颗粒置于烘箱，以 60℃干燥 4 小时至水分为 9%以下，再经 200 目筛网过筛制成。

散剂 C 剂型的制备方法如下:

将 2000 克沉香、800 克稻米、200 克乳香、200 克莪苳子、100 克白术及 200 克菟丝子置于萃取锅内,以去离子水加以浸泡,并加热至 100℃持续 2.5 小时,收取萃取液,经 100 目筛网过滤,此萃取液再以喷雾干燥机喷雾干燥成粉末。

密丸剂型的制备方法如下:

取散剂 A 剂型的粉末,另取蜂蜜煮至滴水成珠,以 1:1 的比例混合制成蜜丸。

胶囊剂型的制备方法如下:

取散剂 B 剂型或散剂 C 剂型的粉末,添加药学上常用的赋形剂、载体、或稀释剂混合,过筛后,装填入胶囊。

锭剂剂型制备方法如下:

取散剂 B 剂型或散剂 C 剂型的粉末,添加药学上常用的赋形剂、载体、或稀释剂混合,过筛后,直接打成锭剂;也可经已知药学上常用的造粒技术制成颗粒后,打成锭剂。

口服液剂型制备方法如下:

取散剂 B 剂型或散剂 C 剂型的粉末,添加药学上常用的悬浮剂及去离子水制成口服液剂型。

生物活性试验

一、体外试验:本发明药物对骨形态产生蛋白质-2 启动子活性的作用。

参考刊登于 1999 年 *Science* 第 286 卷第 1946~1949 页 Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins,刊登于 2000 年 *Biochem Biophys Res. Commun.* 第 271 卷第 3 期第 688~92 页 Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells, 以及刊登于 2001 年 *J. Bone Joint Surg. Am.* 第 83-A suppl.1(Pt 2)卷第 S99~104 页 In vitro and in vivo studies of bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector 等方法。

将骨形态产生蛋白质-2 基因 5' 启动子 (promotor) 片断连接构建到萤光素酶(luciferase)报导基因载体 (reporter vector) 上, 而转染到成骨细胞内, 经由测定萤光素酶活性, 可以得知骨形态产生蛋白质-2 基因的表现程度。

所有转染实验均为脂质体介导的瞬时转染, 转染细胞为成骨细胞, 萤光素酶活性测试仪及试剂均为美国 TROPLEX 产生, 仪器名称为 TR717Microplate Luminometer, 实验用本发明的散剂 A、散剂 B。

表一 本发明药物对骨形态产生蛋白质-2 启动子活性影响

转 染 条 件	药物浓度 (%)	萤光素酶活性值 (光单位/ 5×10^5 细胞)		活性值增加率
PGL3 载体	0	a 项	15	—
PGL3 骨形态产生蛋白质-2 载体	0	b 项	94	—
PGL3 骨形态产生蛋白质-2 载体+散剂 A	0.1	c 项	90	0
PGL3 骨形态产生蛋白质-2 载体+散剂 A	0.3	d 项	160	70.2%
PGL3 骨形态产生蛋白质-2 载体+散剂 B	0.3	e 项	212	125.5%

表一以下列公式计算活性值增加率;

活性值增加率: $(d \text{ 项} - b \text{ 项}) / b \text{ 项} \times 100 = (160 - 94) / 94 \times 100 = 70.2\%$

活性值增加率: $(e \text{ 项} - b \text{ 项}) / b \text{ 项} \times 100 = (212 - 94) / 94 \times 100 = 125.5\%$

培养液是指达柏胶培养基 (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium), 萤光素酶底物是指萤光素 (Luciferrin) PGL3 载体是指 Basic Luciferse reporter plasmid, 药物浓度(%) 是以 W/V%表示。

试验结果:

表二 本发明药物中发光物质及萤光素酶活性测定

测试条件	药物浓度 (%)	萤光素酶活性 (光单位/100ul 培养液)
散剂 A+培养液	0.3	-1
散剂 B+培养液	0.3	0
散剂 A+培养液+萤光素酶底物	0.3	2
散剂 B+培养液+萤光素酶底物	0.3	0

如表二所示, 本发明药物本身并不含萤光素酶活性。如表一所示, 加上 0.3%浓度的本发明药物散剂 A, 可以使骨形态产生蛋白质-2 的活性增加 70.2%; 加上 0.3%浓度的本发明药物散剂 B, 可以使骨形态发生蛋白质-2 的活性增加 125.5%。

二、体外试验: 本发明药物对成骨细胞分裂的刺激作用

参考刊登于 1999 年 5 月中国骨质疏松杂志第 5 卷第 2 期第 58~62 页的骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价, 1999 年 5 月中国骨质疏松杂志第 5 卷第 2 期第 70 页的淫羊藿对成骨细胞增殖分化的影响, 以及 1997 年 *CMLS, Cell.mal.life sci.* 第 53 卷第 967 ~ 976 页 Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts 等方法。

Wistar 新生鼠颅顶骨 (calvaria) 以连续二次, 各 30 分钟, 37℃的胶原酶 (collagenase) 消化方式取得 (丢弃第一消化所释出的细胞), 然后在含 100U/ml 盘尼西林 G, 10%胎血清的柏胶培养基, 100 μ g/ml 链霉素, 含 5%二氧化碳空气, 在 37℃下培养。将 1×10^4 细胞/cm² 成骨细胞培养于 96 槽 (well) 培养皿中, 48 小时后, 加上 0.1、1、10、100、1000 μ g/ml 等不同浓度溶解于二甲基亚砷的本发明药物, 分别于第一组继续培养 1 天, 第二组继续培养 3 天。

各组在培养后，取 1mg/ml 浓度的贾诺秀（MTT，[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]100 μ l 处理细胞 4 小时，将上清液除去，加上 100 μ l 含有 0.04N 盐酸的异丙醇溶解，然后以波长 570nm 的倚莱纱分析器（ELISA）来读数。

以下列公式计算表现促进率的百分率

促进率=[(加药物的平均吸收值-无药物的平均吸收值)/无药物的平均吸收值] \times 100，平均吸收值（AOD, average optical density），标准差（SD, Standard Deviation）。

试验结果：

表三 本发明药物对成骨细胞分裂的刺激作用

药物浓度 (μ g/ml)	培养 24 小时			培养 72 小时		
	平均 吸收值	标准差	促进率 (%)	平均 吸收值	标准差	促进率 (%)
0	0.266	0.035	—	0.256	0.029	—
0.1	0.300	0.024	12.7	0.288	0.047	12.5
1	0.337	0.033	26.8	0.310	0.042	21.0
10	0.357	0.026	34.1	0.338	0.036	37.8
100	0.394	0.025	48.3	0.365	0.019	42.3
1,000	0.531	0.042	99.7	0.380	0.037	48.2

由表三的结果所示，本发明药物在 24 小时内可以刺激成骨细胞增生，随着药物浓度的提高，其促进率也提高；而在 72 小时后，仍可以刺激成骨细胞增生，药物浓度愈高，其促进率也愈高。在 1mg/ml 本发明药物的高浓度下，三天内没有细胞毒性产生。

三、本发明药物促进家兔骨折模型愈合的体内试验

参考刊登于 1981 年 *Clinical Orthopaedics & Related Research* 第 154 卷第 286~92 页的 Experimental femoral fracture immobilized by rigid and flexible rods(a rabbit model)，刊登于 1992 年 *Hsueh Tsa Chih Chinese Jurnal of Stomatology* 第 27 卷第 4 期第 215~216 页的 An experimental study of dan sheng improving the mandibular bone fracthue

healing.Cheeng-Hua Kou Chiang, 刊登于 1998 年 *Clinical Orthopaedics & Related Research* 第 353 卷第 231~237 页的 Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing.

体重在 1.5—2 公斤, 家兔 40 只, 雌雄各半, 在观察一周无异状后, 经麻醉以无菌手术切开前臂, 在桡骨上段 1/3 处, 利用电锯制成 2mm 的标准横断骨折, 缝合伤口。40 只家兔依照预定日期分为 5, 12, 17, 23, 30 天组等 5 组, 每组 8 只, 每组内实验组 5 只, 对照组 3 只, 对照组喂以标准复合饲料, 而实验组喂以标准饲料外, 各组在预定日期内每日早晚给药, 实验用药蜜丸剂型, 该药丸含生药 3 克, 每组在预定日期处死, 进行 X 光片与病理学观察。

预定日期处死的分组方式, 是与骨折模型各个愈合时期配合, 通常愈合初期为伤口产生到愈合 5~12 天, 愈合中期为 17~23 天, 愈合后期为 23~30 天。

试验结果如下:

(1) 体能观察: 实验组较对照组恢复得快, 实验组的前肢较对照组早些能支持体重。

(2) X 光片检查: 实验组骨折愈合情况, 在各个时间点都比对照组好。

(3) 病理组织学观察:

a. 手术后 5 天: 对照组骨折断端可见血肿及坏死组织, 皮质骨、内骨没有明显改变; 本发明药物组骨折断端有血肿及组织坏死, 伤患处有血管长入, 皮质骨有造骨细胞增生, 骨内有微血管增生。

b. 手术后 12 天: 对照组还有一些血肿及坏死组织, 纤维性骨痂形成, 皮质骨有些生物活性发生, 少量区域有软骨性骨痂; 本发明药物组在骨折断端形成纤维性骨痂, 骨折近端皮质骨生骨明显, 有骨性骨痂。

c. 手术后 17 天: 对照组骨折断端有大量软骨性骨痂, 骨髓腔尚未被骨痂封闭; 本发明药物组在骨折断端生骨明显, 骨痂有矿化现象发生, 骨髓腔已被骨痂封闭, 并可看见血管。

d. 手术后 23 天: 对照组骨折断端已多为骨性骨痂, 但骨痂尚未安全骨性连接, 断端中端仍有软骨性骨痂存在, 如图 1 所示; 本发明药物组骨折端已完全骨性愈合, 外骨痂已出现明显的塑型, 骨小梁内血运丰富, 如图 2 所示; 而在高倍镜下, 内骨痂封闭的骨髓腔端, 出现明显的破骨及造骨细胞的骨吸收, 骨改建过程, 骨髓腔再通。

e. 手术后 30 天: 对照组骨折断端骨痂成熟度差, 仍有软骨钙化影像,

皮质骨改建塑型不明显，断端及骨痂连接不良，四环素标记多为单标，如图 3 所示；本发明药物组骨折断端骨痂成熟，骨痂与断端骨皮质连接良好，原断端皮质骨也出现骨改建，四环素双标记明显，已达临床愈合标准，如图 4 所示。

根据以上结果，本发明药物在家兔骨折模型各个愈合时期中，都表现出明显的愈合促进作用，愈合初期时，本发明药物可促进骨折断端间血肿机化，刺激成骨细胞增生分化，骨小梁形成；在愈合中期，本发明药物有利于骨小梁成熟及矿化，促进骨痂形成；在愈合后期，本发明药物可促进骨塑型改建，加速骨髓腔再通。

四、本发明药物防治去势大鼠骨质疏松症体内试验

参考刊登于 1999 年 5 月中国骨质疏松杂志第 5 卷第 2 期第 67 页的骨康防治去势大鼠骨质疏松的实验研究，刊登于 1998 年 *Clin Biomech(Bristol,Avon)* 第 13 卷第 7 期第 480~484 页的 Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity,mineral density and strength in the rat femur., 刊登于 2001 年 *Biomed Sci.Instrum.* 第 37 卷第 281~286 页的 The use of estrogen,DHEA,and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model., 以及刊登于 1999 年 *Zhonghua Fu Chan Ke Za.Zhi.* 第 34 卷第 2 期第 86~89 页的 Study of nylestriol effect on bone histomorphometric parameters in ovariectomized rats.。

52 只体重 200 克的 SD (Sprague-Dawley) 雌鼠分成四组：(1) 假手术对照组；(2) 去势（摘除卵巢）组；(3) 去势 30 天后再给本发明药物 40 天组；(4) 去势 30 天后再给本发明药物 70 天组。

(一) 去势手术

老鼠麻醉后，在无菌状态下施行假手术或去势手术，一个月后，处死假手术对照组与去势组各 5 只，观察是否已发生骨质疏松。

试验结果如下：

假手术对照组老鼠股骨下端骨骺板下骨小梁结构成熟，排列连接紧密，平均骨小梁壁的厚度较为一致，如图 5 所示；去势 30 天后老鼠股骨下端骨骺板下骨小梁结构极不成熟，骨小梁间连接很差，出现大量骨小梁盲端，骨小梁表面出现大量类骨质，表明骨再建增加，呈现典型的高转换型骨质疏松模型，如图 6 所示；去势老鼠在 30 天后的骨小梁结构，与假手术对照组有极明显的差异。

(二) 去势手术后再给药

去势一个月后，给药组每日口服给予 0.12 克（相当于生药量 1 克）散剂 C。40 天后，四组各处死 4 只老鼠，测试骨密度及病理组织学观察。第四组再继续给药处理 30 天后，各组剩下的老鼠全部处死，进行骨密度、病理组织学、骨组织形态计量学观察。

骨密度测试：老鼠右股骨以 Hologic QDR-4500W(S/N 47192)来测试骨密度。

骨组织形态计量学观察：各组切片均选择骨髓板下 1 毫米内骨小梁，区分为内、中、外三点选取 3 个图像，录入电脑，每个样品采用三种观察方法：泽米（Gemisa）染色做组织学观察，翁轲沙（Von Kossa）染色做类骨质观察，荧光显微镜做四环素标记观察，进行以下项目骨组织形态计量分析：平均骨体积（TBV）、四环素单标记表面（STS）、四环素双标记表面（DTS）、四环素单、双标记表面比（STS/DTS）、类骨质表面（TOS），平均类骨质宽度（MOSW）、矿化时间、骨重建时间、骨表面、骨吸收表面、骨矿化沉积率（MAR）、纠正骨矿化沉积率（iMAR）。

以上实验结果分述如下：

a. 去势手术后再给本发明药物 40 天组组织病理学观察：

去势组（去势 70 天）股骨下端骨髓板下，骨小梁结构比去势 30 天时排列更稀疏，分散而薄，骨小梁表面类骨质清晰可见，骨的生成与改建十分活跃，出现高转换型骨质疏松模型的典型表现，如图 7 所示。如图 8 所示，再给本发明药物处理 40 天后，该组虽然未达到与假手术对照组相近似的程度，但与去势组比较，骨小梁结构明显增加，也变得致密，小梁间连接也明显改善。

表四 老鼠右股骨骨密度（给药 40 天）

处理方式	动物数 (n)	估计面积 (cm ²)	骨质含量 (grams)	骨密度 (g/cm ²)
对照组	4	1.290±0.1138	0.053±0.0320	0.041±0.0216
去势组	4	1.180±0.0660	0.035±0.0058	0.029±0.0058
再给药 40 天	4	1.130±0.0263	0.030±0.0082	0.027±0.0038

骨密度结果如表四所示,显示再给本发明药物处理 40 天后,该组右股骨密度与去势组比较,并无明显差异,此二组的骨密度均比假手术对照组低。

b.去势手术后再给药处理 70 天组组织病理学观察:

假手术组老鼠股骨下端骨骺板下骨小梁结构成熟,排列连接紧密,有规则,骨小梁各壁的厚度较为一致,如图 9 所示;去势组在去势 100 天后股骨下端骨骺板下骨小梁结构排列稀疏,总量及密度明显减少,小梁间连接性差,厚度不一,有许多骨小梁盲端,小梁表面类骨质增多,表明骨重建增加,仍呈现典型高转换型骨质疏松症,如图 10 所示。

去势手术后再给本发明药物处理 70 天,如图 11 所示,该组大鼠股骨下端骨骺板下骨小梁结构排列紧密,形态与假手术对照组相似,小梁间连接成网,排列有序,厚度较为均一,小梁表面类骨质较少,与正常相似,表明骨重建较不活跃。

表五 老鼠右股骨骨密度 (给药 70 天)

处理方式	动物数 (n)	估计面积 (cm ²)	骨质含量 (grams)	骨密度 (g/cm ²)
对照组	10	1.159±0.063	0.041±0.013	0.034±0.009
去势组	10	1.131±0.056	0.027±0.008	0.024±0.005*
再给药 70 天	10	1.126±0.026	0.038±0.011**	0.034±0.008***

* 去势组与假手术对照组比较,P<0.01

** 给本发明药物 70 天组与去势组比较,P<0.05

***再给本发明药物 70 天组与去势组比较,P<0.01

骨密度结果如表五所示,去势手术后再给本发明药物处理 70 天后,该组右股骨的骨密度与去势组比较有明显差异 (P<0.01),且回复达假手术对照组的程度。

骨组织形态计量学观察:

表六 假手术对照组、去势组、去势手术后
再给药处理组的骨形态计量学（一）

组 别	假手术对照组	去势组	去势手术后 再给药组
动物数(n)	10	10	10
平均骨体积(%)	63.3±3.1	34.0±2.9**	61.9±2.9##
四环素单标记表面(%)	42.7±5.3	54.3±9.2*	41.2±6.7#
四环素双标记表面(%)	21.2±4.6	28.1±5.0	19.4±3.8##
四环素单、双标记表面(%)	48.2±7.0	52.3±9.4	48.2±12.2

* 去势组与假手术对照组比较, $P < 0.01$

** 去势组与假手术对照组比较, $P < 0.001$

去势+本发明药物组与去势组比较, $P < 0.01$

去势+本发明药物组与去势组比较, $P < 0.001$

表七 假手术对照组、去势组、去势手术后
再给药处理组的骨形态计量学（二）

组 别	假手术对照组	去势组	去势手术后 再给药组
动物数(n)	10	10	10
类骨质表面(%)	30.8±5.4	53.3±4.3**	47.4±5.8
平均类骨质宽度(um)	9.6±1.2	12.9±1.3**	11.3±0.7#
矿化时间(天)	6.4±2.4	5.2±1.2	5.9±0.9
骨重建时间(天)	13.8±1.8	8.3±1.4**	15.0±2.9##

** 去势组与假手术对照组比较, $P < 0.001$

去势+本发明药物组与去势组比较, $P < 0.01$

去势+本发明药物组与去势组比较, $P < 0.001$

表八 假手术对照组、去势组、去势手术后
再给药处理组的骨形态计量学（三）

组 别	假手术对照组	去势组	去势手术后 再给药组
动物数(n)	10	10	10
骨表面(%)	47.4±4.1	52.4±4.1*	53.8±4.1
骨再吸收表面(%)	17.2±3.5	22.5±2.8**	26.0±2.4#
骨矿化沉积率(um/d)	1.4±0.2	2.7±0.5**	1.9±0.3##
纠正骨矿化沉积率(um/d)	1.9±0.7	2.7±0.5*	1.9±0.6#

* 去势组与假手术对照组比较,P<0.01

** 去势组与假手术对照组比较,P<0.001

去势+本发明药物组与去势组比较,P<0.01

去势+本发明药物组与去势组比较,P<0.001

综合表六、七、八的结果，本发明药物骨松症骨组织形态学的作用如下：

平均骨体积：去势小鼠手术后再给本发明药物处理 70 天后，平均骨体积恢复到假手术对照组程度。

四环素单标记表面：小鼠去势手术后再给本发明药物处理 70 天后，四环素单标记表面恢复到假手术对照组程度。

四环素双标记表面：本发明药物处理去势小鼠 70 天后，四环素双标记表面恢复到假手术对照组程度。

四环素单、双标记表面比：比例在三组之间没有明显差异。

类骨质表面：在去势组类骨质表面比假手术对照组高，再给本发明药物处理 70 天后，该组的类骨质表面则高于假手术对照组，而类似于去势组。

平均类骨质宽度：去势组与去势手术再给本发明药物组的平均类骨质宽度均明显大于假手术对照组。

矿化时间：三组之间没有明显差异。

骨重建时间：假手术对照组及去势手术后再给本发明药物组的骨重建时间明显的较去势组长。

骨表面：去势组及去势手术后再给本发明药物组的骨表面积明显的大于假手术对照组。

骨再吸收表面：去势组及去势手术后再给本发明药物组的骨再吸收表面积明显的大于假手术对照组，而去势手术后再给本发明药物组的骨再吸收表面积又明显的大于去势组。

骨矿化沉积率：去势组及去势手术后再给本发明药物组的骨矿化沉积率比假手术对照组高，而去势组的骨矿化沉积率又较去势手术后再给本发明药物组高。

纠正骨矿化沉积率：去势手术后再给本发明药物组的纠正骨矿化沉积率较去势组低，且已恢复到假手术对照组的程度。

很明显可以看出本发明药物影响骨形成及骨吸收的活性，本发明药物会促进成骨细胞生成，类骨质及矿物沉积于基质中。去势后再给本发明药物处理 70 天组的平均骨体积、四环素单标记表面、四环素双标记表面、骨重建时间、纠正骨矿化沉积率等骨代谢指标，都恢复到假手术对照组的正常程度。

五、小鼠醋酸扭体（镇痛作用）体内试验

参考刊登于 2001 年 *Pain* 第 89 卷第 2-3 期第 221~227 页的 *Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model.*，刊登于 2000 年 *J.Ethnopharmacol.* 第 73 卷第 1-2 期第 307~311 页的 *Preliminary studies on the analgesic activity of latex of calotropis procera.*，刊登于 2000 年 *J.Ethnopharmacol.* 第 71 卷第 1-2 期第 153~160 页的 *Studies on the anti-inflammatory and related pharmacological properties of the aqueous extract of Bridelia ferruginea stem bark.*

昆明种小鼠 72 只，雌雄各半，体重 18~22g，按体重随机分为 6 组，禁食过夜，分别投予生理食盐水，0.2g/kg 阿司匹林与不同剂量本发明药物。本发明药物是散剂 B 剂型，各剂量分别代表相当于含生药 0.5、1.0、2.0、4.0g/kg。

给药 1 小时后，每只小鼠腹腔注射 0.3% 的醋酸溶液 0.2ml，观察 20 分钟内，以小鼠扭体次数，判定药效。小鼠扭体次数愈少，表示具有镇痛作用。

试验结果:

表九 本发明药物对小鼠醋酸扭体实验的影响
(平均 \pm SD,n=12)

组 别	剂量(g/kg)	扭体数
生理食盐水组	—	24 \pm 10
阿司匹林组	0.2	5 \pm 3**
本发明药物组	0.5	20 \pm 10
	1.0	11 \pm 9*
	2.0	15 \pm 9*
	4.0	9 \pm 8**

*,** 与生理食盐水组比较 P<0.05,0.01

如表九所示,本发明药物具有明显的抑制醋酸诱发小鼠扭体的作用,其中 1.0、2.0、4.0g 生药/kg 组与生理食盐水组比较具有统计学差异,0.5g 生药/kg 组的扭体数比较生理食盐水组略微降低,但未见统计学差异。表明本药具有一定的镇痛作用。

六、小鼠游泳能力(增强肌力)体内试验

参考刊登于 1990 年 *Calcif Tissue Int.* 第 47 卷第 3 期第 173~177 页的 The effect of swimming on bone modeling and composition in young adult rats., 刊登于 1997 年 *Jpn.J.physiol.* 第 47 卷第 1 期第 51~57 页的 Effects of exposure to hypobaric-hypoxia on body weight,muscular and hematological characteristics,and work performance in rats., 刊登于 1996 年 *Biol.Pharm.Bull.* 第 19 卷第 1 期第 62~66 页的 Pharmacological study on Agkistrodon blomhoffii BOIE.V.anti-fatigue effect of the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats.

昆明种小鼠 72 只,雌雄各半,体重 18~22g,按体重随机分为 6 组,禁食过夜,分别连续给药 3 天投予生理食盐水,骨疏康 3g/kg,与不同

剂量本发明药物。本发明药物是散剂 B 剂型，各剂量相当于含生药 0.5、1.0、2.0、4.0g/kg。骨疏康为中国核准上市治疗骨质疏松症的复方中药，其成分为淫羊藿、熟地黄、黄耆、丹参、骨碎补。

末次给药 1 小时后，于小鼠尾部加挂质重 2g 法码后，投入 25℃、15cm 深的水池中，开始计时，小鼠体力耗竭标准为小鼠鼻孔沉入水面 10 秒钟以上，停止计时。投予各种药物组与生理食盐水组比较，判定药效。

试验结果：

表十 本发明药物对小鼠负重游泳时间的影响
(平均±SD,n=12)

组 别	剂量(g/kg)	小鼠游泳时间(min)
生理食盐水组	—	3.31±1.41
骨疏康组	2.5	5.02±1.42**
本发明药物组	0.5	6.33±3.10**
	1.0	4.75±1.53*
	2.0	9.70±9.99*
	4.0	14.54±15.77*

*,** 与生理食盐水组比较 P<0.05,0.01

如表十所示，本发明药物具有明显的延长小鼠负重游泳时间的效果，四个剂量组（0.5、1.0、2.0、4.0g 生药/kg）与生理食盐水组比较均具有统计学差异，实验结果显示本发明预防及治疗骨折与骨质疏松症的复方中草药具有一定的增强体力、抗疲劳作用。

七、本发明药物的大鼠口服急性毒性体内试验

24 只体重约在 200 克的 Spraque-Dawley 纯种大鼠，雌雄各半，以 LIMS 系统随机分成二组，一组为对照组，一组为本发明药物处理组。所用的本发明药物为散剂 C 剂型，以 1%羧甲基纤维素配成浓稠悬液，

浓度为 250mg/ml。本发明药物处理组以 250mg/ml 散剂 C 喂食 10ml/kg，对照组以 1%羧甲基纤维素喂食，一天二次，每次间隔 2 小时，进行临床观察 14 天。

试验结果：

表十一 本发明药物的大鼠口服急性毒性测试-体重变化
(平均±SD,N=6)

性别(雄)		对照组	本发明药物组
剂量(mg/kg)		0	5,000
平均体重(g)	第一天	230.0±9.7	229.8±7.3
	第八天	333.0±13.7	327.2±11.6
	第十五天	379.2±27.9	388.7±13.9
增加体重(g)	第十五天	149.2±23.3	158.8±12.2
性别(雌)		对照组	本发明药物组
剂量(mg/kg)		0	5,000
平均体重(g)	第一天	171.5±7.1	170.8±7.7
	第八天	212.3±13.7	219.5±7.0
	第十五天	237.7±15.0	235.0±11.5
增加体重(g)	第十五天	66.2±11.7	64.2±9.0

如表十一显示，不论喂食本发明药物浓稠悬浮液或对照溶液的组别在 14 天观察后，全部动物存活。在 14 天观察期间、动物均无任何临床毒性症状，且本发明药物组中雄、雌鼠的体重成长速度与对照组相近。试验终结尸体解剖后，肉眼检查器官，组织变化，二组均无肉眼可观察到的任何病变。本发明药物 5000mg/kg 为不造成任何影响的剂量，可归类为实际无毒性的物质。

八、本发明药物的大鼠口服长期毒性体内试验

Wistar 种（二级）大鼠，选取 80-100 克大鼠饲养 1 周后进行试验。鼠龄 6-7 周，雌雄各半，由中国医学科学院实验动物研究所提供。合格证号：SCXR1100-0006。

试验方法：

药物剂量、给药方法与动物数：

试验设溶媒对照组和 16g 生药/kg 给药组，药液浓度每毫升 1.333g 生药，给药容积为 1.2ml/100g 体重，溶媒对照组给予等容量 1%羧甲基纤维素悬浮液。每天一次，每周 6 次，连续 3 个月。

动物数：选取上述大鼠，饲养 1 周后按性别、体重随机分为 2 组，溶媒对照组和给药组，均雌雄各半，分笼饲养，自由饮水，体重和食料量每周称量一次。

给药 3 个月处死大鼠，取血进行血液学及血液生化学指标测定，取脏器称重，并进行病理组织学检查。

试验结果：

a.一般观察：

在给药期，各组大鼠活动情况正常，外观体征、粪便、食料量均正常。

雄性大鼠体重变化：溶媒对照组由 121 ± 2.2 克（第 0 周）增加至 365 ± 20.0 克（第十二周）；

本发明药物组由 123 ± 2.7 克增加至 357.5 ± 23.3 克。

雌性大鼠体重变化：溶媒对照组由 119 ± 4.2 克（第 0 周）增加至 231 ± 16.4 克（第十二周）；

本发明药物组由 117 ± 2.7 克增加至 220 ± 10.8 克。

表明给药组体重与溶媒对照组比较，无明显差异。

食料量：给药组与对照组比较，无明显差异。

b.血液学指标：

表十二 本发明药物灌胃给药 3 个月对大鼠血液学的影响
(平均 \pm SD)

指 标	♂ 对照组	♂ 本发明药物组
血红蛋白 (Hb)(g/L)	142.0 \pm 7.62	140.3 \pm 7.63
红血球数 (RBC)($\times 10^{12}$ /L)	7.90 \pm 0.53	8.22 \pm 0.28
白血球数 (WBC)($\times 10^9$ /L)	8.36 \pm 1.24	8.00 \pm 1.64
血小板数 (PLT)($\times 10^9$ /L)	201.4 \pm 43.08	169.0 \pm 30.0
凝血时间 (CT)(sec)	63.0 \pm 12.5	66.0 \pm 11.7
指 标	♀ 对照组	♀ 本发明药物组
血红蛋白 (Hb)(g/L)	128.8 \pm 6.53	127.5 \pm 8.18
红血球数 (RBC)($\times 10^{12}$ /L)	7.70 \pm 0.74	7.90 \pm 0.86
白血球数 (WBC)($\times 10^9$ /L)	5.78 \pm 1.0	6.50 \pm 1.88
血小板数 (PLT)($\times 10^9$ /L)	186.8 \pm 68.43	188.3 \pm 14.97
凝血时间 (CT)(sec)	80.0 \pm 13.0	74.0 \pm 12.6

如表十二显示, 给药期各组的血红蛋白(Hb)、红血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、凝血时间(CT)结果显示连续给药

三个月，给药组各项血液学指标与对照组比较，均无明显差异。

c.血液生化学指标：

表十三（A） 本发明药物灌胃给药3个月对雄性大鼠血液生化的影响（平均±SD）

项 目	♂ 对照组	♂ 本发明药物组
天门冬氨酸基转移酶 (AST)(U/L)	118.2±29.53	133.0±17.22
丙氨酸氨基转移酶 (ALT)(U/L)	35.60±7.89	40.25±10.90
碱性磷酸 (ALP)(IU/L)	48.0±10.56	39.50±3.11
尿素氮 (BUN)(mmol/L)	5.57±0.46	5.32±0.71
总蛋白 (TP)(g/L)	66.18±1.38	64.60±2.71
血蛋白 (ALB)(g/L)	31.30±1.18	30.68±0.89
血糖 (BGLU)(mmol/L)	5.98±0.46	5.87±0.36
总胆红素 (T-BIL)(μmol/L)	1.632±0.15	1.53±0.19
肌酐 (C)(μmol/L)	85.38±9.49	78.43±3.01
总胆固醇 (TCHO)(mmol/L)	1.93±0.21	1.62±0.29

表十三 (B) 本发明药物灌胃给药 3 个月对雌性大鼠血液
生化的影响 (平均 \pm SD)

项 目	♀ 对照组	♀ 本发明药物组
天门冬氨酸基转移酶 (AST)(U/L)	115.8 \pm 21.23	159.0 \pm 63.53
丙氨酸氨基转移酶 (ALT)(U/L)	33.0 \pm 11.75	37.25 \pm 7.27
碱性磷酸 (ALP)(IU/L)	20.80 \pm 9.96	17.25 \pm 7.27
尿素氮 (BUN)(mmol/L)	6.49 \pm 0.68	6.16 \pm 0.42
总蛋白 (TP)(g/L)	74.12 \pm 2.89	71.07 \pm 3.31
血蛋白 (ALB)(g/L)	37.08 \pm 0.89	35.77 \pm 0.82
血糖 (BGLU)(mmol/L)	6.26 \pm 0.39	6.68 \pm 0.44
总胆红素 (T-BIL)(μ mol/L)	1.68 \pm 0.31	1.63 \pm 0.096
肌酐 (C)(μ mol/L)	86.0 \pm 3.09	84.95 \pm 6.31
总胆固醇 (TCHO)(mmol/L)	1.69 \pm 0.36	1.50 \pm 0.33

如表十三 (A、B) 显示, 给药后的血液生化学检测结果。结果显示连续给药三个月, 给药组各项生化指标与对照组比较, 均无明显差异。

d.对大鼠脏器系数的影响:

各组大鼠均在给药 3 个月结束后处死, 取各主要脏器称重即为湿重, 将湿重再除以体重, 即得每 100g 体重的湿重(g)视为脏器系数。

表十四 (A) 本发明药物灌胃给药 3 个月对雄性大鼠脏器系数的影响
(g/100g 体重, 平均 \pm SD)

项 目	♂ 对照组	♂ 本发明药物组
心	0.33 \pm 0.064	0.28 \pm 0.011
肝	2.69 \pm 0.37	2.81 \pm 0.19
脾	0.17 \pm 0.037	0.24 \pm 0.074
肺	0.65 \pm 0.12	0.51 \pm 0.11
肾	0.62 \pm 0.089	0.61 \pm 0.045
脑	0.48 \pm 0.035	0.46 \pm 0.057
肾上腺	0.020 \pm 0.007	0.013 \pm 0.002
甲状腺	0.0065 \pm 0.002	0.0052 \pm 0.001
胸腺	0.096 \pm 0.021	0.090 \pm 0.0099
睾丸	0.98 \pm 0.15	0.99 \pm 0.047
前列腺	0.13 \pm 0.031	0.11 \pm 0.028

表十四 (B) 本发明药物灌胃给药 3 个月对雌性大鼠脏器系数的影响
(g/100g 体重, 平均 \pm SD)

项 目	♀ 对照组	♀ 本发明药物组
心	0.33 \pm 0.033	0.34 \pm 0.028
肝	2.58 \pm 1.57	2.95 \pm 0.30
脾	0.23 \pm 0.016	0.24 \pm 0.03
肺	0.54 \pm 0.054	0.58 \pm 0.060
肾	0.64 \pm 0.03	0.70 \pm 0.065
脑	0.68 \pm 0.056	0.73 \pm 0.046
肾上腺	0.034 \pm 0.009	0.040 \pm 0.005
甲状腺	0.010 \pm 0.002	0.012 \pm 0.004
胸腺	0.13 \pm 0.029	0.12 \pm 0.022
子宫	0.29 \pm 0.049	0.26 \pm 0.089
卵巢	0.094 \pm 0.023	0.091 \pm 0.011

结果如表十四 (A、B) 所示, 给药组的各脏器系数与对照组比较, 均无明显差异。

e. 大鼠脏器的病理组织学检查:

连续给药 3 个月后, 处死各组大鼠, 分别取心脏、肝脏、脾脏、肾

脏、膀胱、肺脏、胃、十二指肠、回肠、结肠、胰脏、子宫、卵巢、睾丸、副睾丸、前列腺、脑、垂体、甲状腺、肾上腺、胸腺、淋巴结及骨髓等 23 种脏器，进行病理组织学检查。结果显示给药组与对照组相比，均无明显的病理学改变。

试验结论：

给药组试验中以每 kg 大鼠投予本发明药物 16g 生药，大鼠连续灌胃给药 3 个月，进行一般观察、血液学、血液生化学、病理组织学等检查。试验结果表明，各项指标均未发现明显异常，脏器病理组织学检查也未发现与药物有关的病理学改变。

给药组大鼠长期毒性试验结果表明，大鼠在 106 倍于人用剂量（9g 生药/天/人）的连续给药 3 个月，未见明显毒性反应。

经过以上生物活性测试结果，本发明药物是一种没有毒性，在体外能刺激骨形态产生蛋白质-2 表现及成骨细胞增生的复方，它在动物实验中显示，具有镇痛作用及增强肌力作用，可以促进骨折愈合及治疗骨质疏松症，所以本发明药物可以预防及治疗骨折及骨质疏松症。



图1

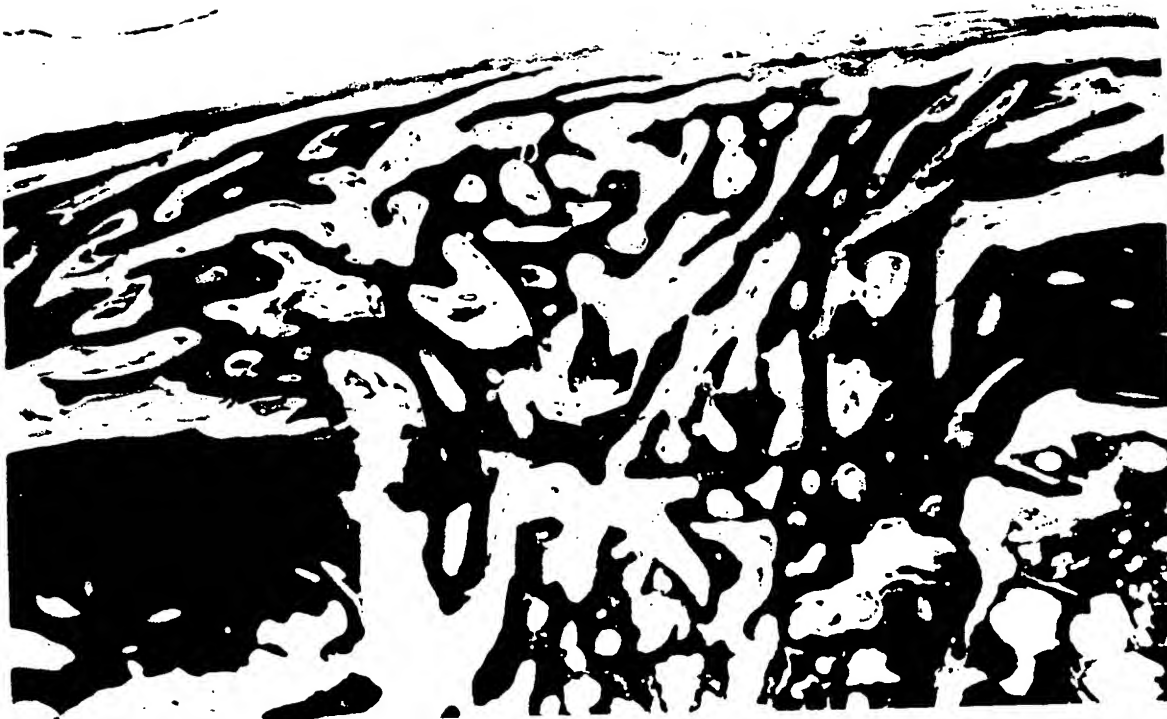


图2

BEST AVAILABLE COPY



图 3



图 4

BEST AVAILABLE COPY



图 5

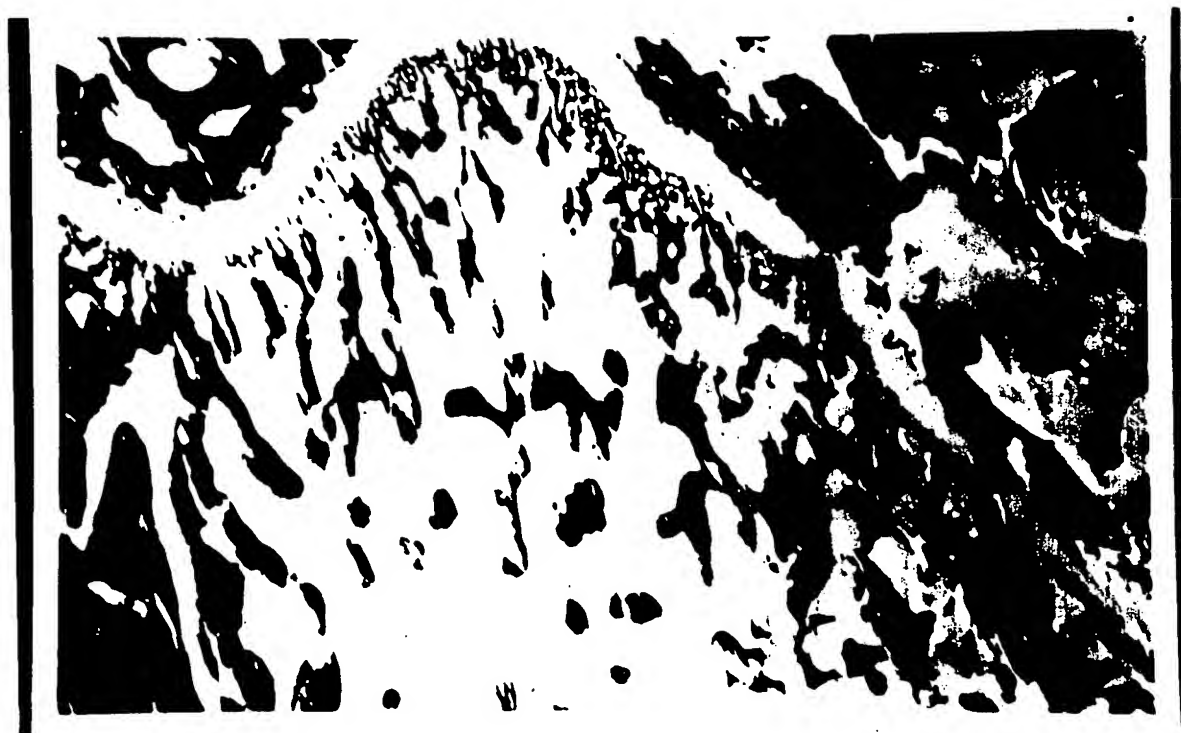


图 6

BEST AVAILABLE COPY

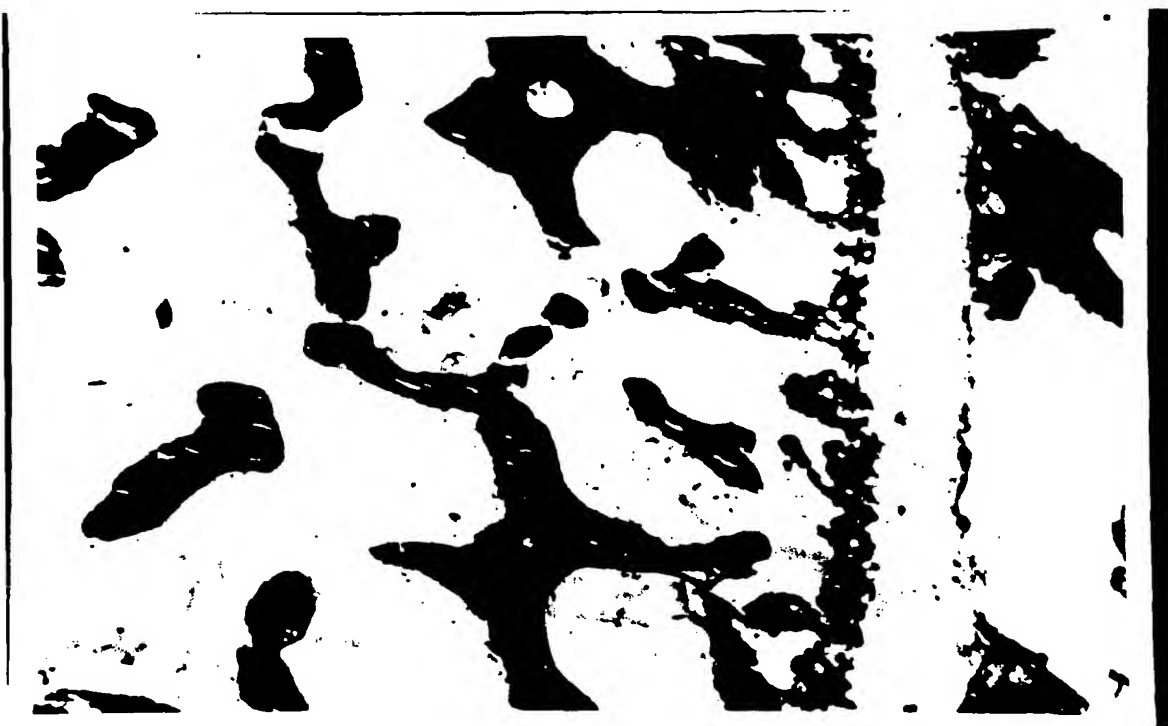


图7



图8

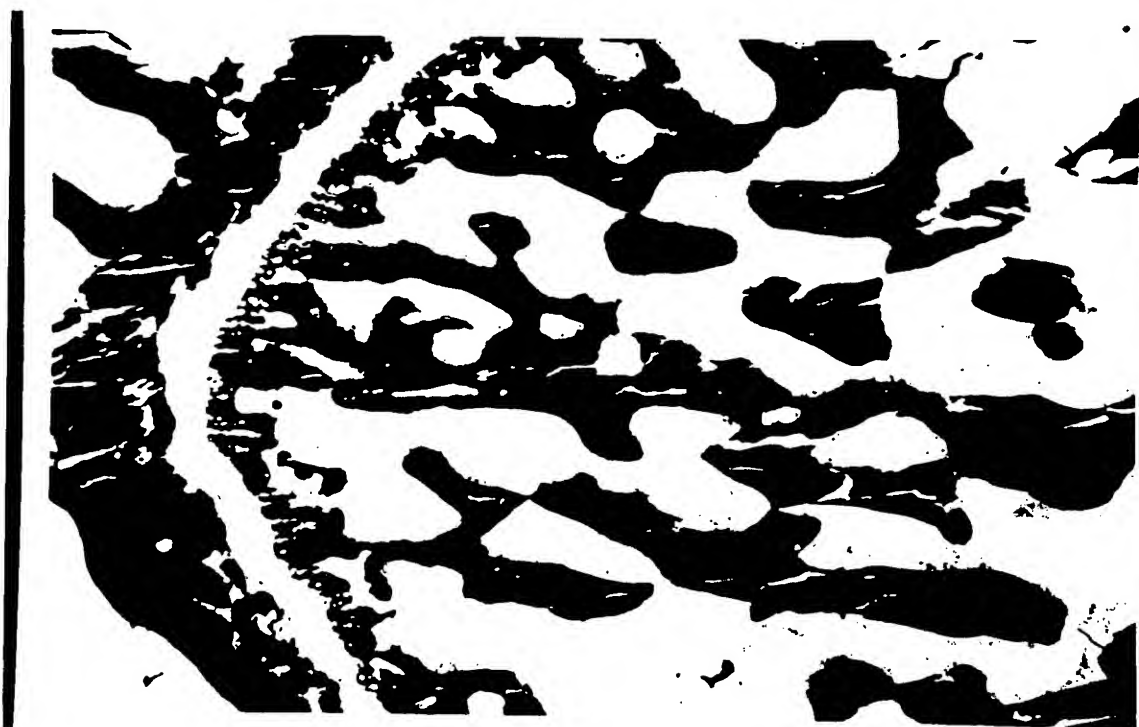


图9



图10

BEST AVAILABLE COPY

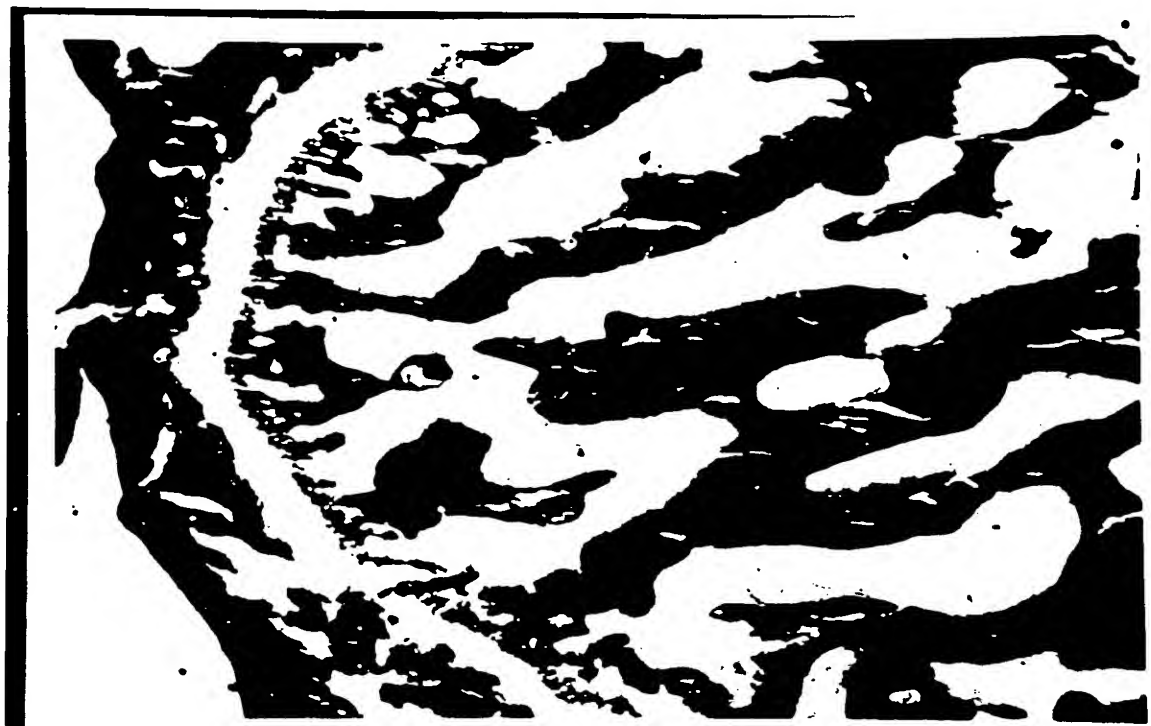


图11

BEST AVAILABLE COPY